

**ZUR ENTSTEHUNG DER
DELTA-AMINOLÄVULINACIDURIE
BEI DER BLEIVERGIFTUNG**

Gerold Schymura

1972

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin (Hämatologie)
der Universität München und dem
Institut für Hämatologie der Gesellschaft für
Strahlen- und Umweltforschung,
Assoziation mit EURATOM, München
(Vorstand: Prof. Dr. W. STICH)

ZUR ENTSTEHUNG DER DELTA-AMINOLÄVULINACIDURIE
BEI DER BLEIVERGIFTUNG



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerold Schymura
aus München

München
1972



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof.Dr.W.STICH

Dekan:

Prof.Dr.W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 24.Oktober 1972

- I. Einleitung und Begründung
- II. Verfassungskörper
- III. Aufgaben
- IV. Organisation
- V. Durchführung
- VI. Zusammenfassung
- VII. Anhang

In dankbarer Erinnerung
meinem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

- I. Einleitung und Fragestellung
- II. Untersuchungsgut
- III. Methodik
- IV. Ergebnisse
- V. Besprechung
- VI. Zusammenfassung
- VII. Literatur

I. Einleitung und Fragestellung:

Das Symptom Delta-Aminolävulinacidurie bei der Blei-intoxikation ist seit längerem bekannt (6,15).

Auf Grund widersprüchlicher Untersuchungsergebnisse könnte eine klare Stellungnahme zur Entstehung der Delta-Aminolävulinacidurie (D-Ala-Acidurie) bisher nicht abgegeben werden. Die Vermutung, daß die D-Ala-Acidurie als Folge einer gesteigerten Ala-Synthese auftritt, hat sich nicht bestätigen lassen (4,5). Die meisten Autoren nehmen deshalb an, daß die Ursache der D-Ala-Acidurie in einer Hemmung des Ala abbauenden Enzyms, d.h. der Delta-Aminolävulinsäure-Dehydrase (Ala-Dehydrase), überwiegend in der roten Blutzellreihe zu suchen ist.

Untersuchungen, die bei Bleiarbeitern durchgeführt wurden, und bei denen die erythrozytäre Ala-Dehydrase Restaktivität gemessen wurde, zeigen recht widersprüchliche und milde Angaben. Die Angaben schwanken bei Bleiarbeitern von ca. 75 % (7) bis ca. 25-30% Restaktivität bei Bleiintoxikationen (1,16). Da man bei Bleiintoxikationen aber Alaausscheidungen finden kann, die das 20 - 40-fache der Normalwerte erreichen, erscheinen die milden Befunde der Enzymhemmung als keinesfalls allein geeignet die D-Ala-Acidurie zu erklären.

Aus diesem Grund wurde versucht durch Modifikation der von Gibson (3) angegebenen Ala-Dehydrase Aktivitätsbestimmungsmethode, insbesondere durch Verwendung geeigneter Puffersysteme, das tatsächliche Ausmaß der D-Ala-Dehydrasehemmung durch Blei zu erfassen.

Ferner wurde versucht, den Alametabolismus unter Bleieinfluß insgesamt zu erfassen, und zwar unter Inkubationsbedingungen mit sehr niedriger Ala-Anflutung unter weitgehend physiologischen Bedingungen.

Da für das Zustandekommen einer D-Ala-Acidurie auch eine bleiinduzierte Permeabilitätszunahme der Erythrozyten-

membranen für Ala zu diskutieren wäre, wurden Untersuchungen durchgeführt, die zur Klärung dieser Frage beitragen sollen.

II. Untersuchungsgut:

Die Untersuchungen wurden aus venösen Heparinblut von Normalpersonen und Personen mit serogener hämolytischer Anämie sowie bleiexponierten und bleivergifteten Patienten durchgeführt.

Die Ala-Dehydraseaktivität in der Leber wurde aus einem Leberhomogenat eines frischen foetalen Abortes mens VII bestimmt.

Im allgemeinen wurden die Proben unmittelbar nach der Blutentnahme aufgearbeitet. Wenn dies nicht möglich war, wurden sie für einige Stunden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt (Einzelheiten Methodik).

III. Methodik:

1. Ala-Dehydrase-Bestimmung (maximale Aktivitätsbestimmung unter Substratsättigung): Nach Vorversuchen mit verschiedenen Puffern (Tris- u.a.) wurden unter Modifikation der Methode nach GIBSON (3) folgende Inkubationsbedingungen gewählt:

1-stündige Vorinkubation eines Gemisches von 1 ml Erythrozyten-Hämolysat (1:3 mit aqua dest.) mit 2 ml Puffer bei 38°C, anschliessend halbstündige Inkubation nach Zugabe von 0,33 ml gepufferter Ala bei 38°C in evakuierten Thunberg-Röhrchen.

Puffersysteme

a) Phosphat-Cystein-Puffer (Phosphatpuffer mit Cystein-Zusatz):

1/15 mol. Phosphatpuffer Ph 6,8, enthaltend KCl 0,067 mol. und Cytsein 0,015 mol;

- o,1 mol. Ala im gleichen Phosphatpuffer (ohne KCl, ohne Cystein) gelöst.
- b) Phosphatpuffer: Wie a), jedoch ohne Cystein.
- c) Barbital-Cystein-Puffer:
1/15 mol. Barbital-HCl-Puffer Ph 6,8,
KCl- und Cystein-Zusatz wie a)
o,1 mol. Ala jedoch in 1/15 mol. Barbital-Puffer Ph 8,6 gelöst.
- d) Barbital-Puffer: Wie c), jedoch ohne Cystein.

Die Zugabe von Ala in gepufferter Lösung ergibt höhere Ala-D.-Aktivitäten, insbesondere bei Barbital-Puffern, da bei ungepufferter Ala-Zugabe durch die relativ saure Ala das Ph-Optimum von 6,6-6,8 unterschritten werden kann. Der weitere Verlauf der Ala-D.-Bestimmung hinsichtlich Proteinfällung und Messung entspricht (3).

2. Inkubation unter niedriger Ala-Anflutung zur Erfassung des Ala-Metabolismus:

Dieses System wurde für ökologische Studien der Häm synthese entwickelt (13), da es weitgehend physiologischen Bedingungen entspricht:

Hochkonzentriertes Erythrozyten-Hämolysat (8 ml Erythrozyten, 16 ml a.dest) ohne weitere Zusätze, von versuchsentsprechenden Zugaben neutralen Bleiazetats (10^{-7} , 10^{-6} und 10^{-5} mol.) abgesehen; mittels eines Perfusors konstante Infusion von insgesamt 239 μg Ala (375 μg Ala/ml a. dest) innerhalb von ca. 30 min. bei 37°C nach anfänglichem Herstellen eines Ala-Spiegels von 230 $\mu\text{g}\%$ (ca. 10-facher erythrozytärer Spiegel wie er jungen, zur Häm synthese befähigten Zellen der roten Reihe entspricht, Ala-Konzentration bei der Ala-D.-Bestimmung nach 1) ungefähr 10^4 -fach höher). Ein geringer Unterdruck von 120 mmHg im System diente einer leichten Hemmung der Porphobilinogenase,

um kleinere synthetisierte Porphobilinogenmengen (Pbg) noch erfassen zu können. Aus diesen Inkubaten waren bestimmbar der für die Hämsynthese utilisierte Ala-Anteil (Pbg, Porphyrine) und der durch Desaminasen, Decarboxylasen etc. abgebaute, nicht zur Hämsynthese verwendete Ala-Anteil. Berechnet wurden die absoluten Synthese- bzw. Abbau-Raten und die echten Enzymaktivitäten (ALA via Hämsynthese, Ala-Abbau) mit Hilfe der relativen, auf die mittleren Ala-Spiegel bezogenen Daten. Dies erscheint auf Grund der kurzzeitigen konstanten Ala-Infusion bei gleichem Ausgangsspiegel berechtigt, obwohl kein streng linearer Anstieg oder Abfall des Ala-Spiegels anzunehmen ist. Das Verhältnis der Ala-Utilisation zum Ala-Abbau wird rechnerisch hiervon nicht berührt, da das Ala-Angebot an beide Enzym-Systeme im Einzelfall ständig identisch ist. Die Bestimmung der Hämpräkursoren im Inkubat erfolgte nach entsprechend (11) modif. Methoden (8,14), der Ala im Urin nach (10).

3. Für die Untersuchung der Ala-Permeabilität durch die Erythrozytenmembran wurden folgende Bedingungen gewählt:
3-stündige Inkubation von in Ca-freier Ringerlösung gewaschenen Erythrozyten (1:1 in Ca-freier Ringerlösung suspendiert) bei 37°C mit und ohne Zusatz von neutralem Bleiazetat. Aus dem Ala-Gehalt der Erythrozyten und der Ala-Konzentration der Ringerlösung war auf den Prozentsatz der diffundierten Ala zu schließen.

IV. Ergebnisse:

Während zahlreiche Puffer, insbesondere der zumeist verwendete Phosphatpuffer mit und ohne Cystein-Zusatz, zur Ausfällung von Blei führen, ist bei der Verwendung von Barbitalpuffer ohne Cystein keine Inaktivierung der Bleiwirkung zu beobachten. Phosphatpuffer sind daher zur Ermittlung der

Bleiheimmung der Ala-D. ungeeignet. Die Ala-D.-Aktivität beträgt im Phosphatpuffer bei 10^{-6} und 10^{-5} mol. Bleikonzentration noch ca. 25-30% (Tab.1), im Barbitalpuffer unter Berücksichtigung einer reduzierten Aktivität der Normalproben im Barbital-Puffer (60,7% der Aktivität im Phosphat-Cystein-System) entsprechend 9,9 bzw. 3,6 % (Tab.2). Der Phosphat-Cystein-Puffer führt von den aufgeführten Systemen nicht nur zu den höchsten Ala-D.-Werten und stellt somit optimale Bedingungen dar, er ist vielmehr auch am besten geeignet, eine Bleiwirkung dank des Phosphat- und SH-Gruppen-Gehaltes aufzuheben. Bei einer Bleikonzentration von 10^{-6} werden ca. 75%, bei einer Konzentration von 10^{-7} mol. über 90% der Grundaktivität erreicht. Die bei einer Bleivergiftung vorliegenden intraerythrozytäre Bleikonzentration von ca. 10^{-5} mol. wird unter den Bedingungen der vorliegenden Ala-D.-Bestimmung entsprechend der Erythrozytenverdünnung auf unter 1:13 auf weniger als 10^{-6} mol. verdünnt, so daß bei Bleivergiftung eine Ala-D.-Aktivität im Phosphat-Cystein-Puffer von über 80% und bei mäßiger Bleiexposition von ca. 90% gegenüber der normalen Grundaktivität besteht. Dies wird bestätigt durch die Ergebnisse entsprechend Abb.1, die bei Personen mit Bleiintoxikation und Bleiexposition im Phosphat-Cystein-Puffer eine Aktivität von 84-94% gegenüber Normalpersonen ergab. Damit eignet sich das Phosphat-Cystein-System als Bezugspunkt zur Feststellung der bleiunabhängigen normalen oder nahezu normalen Ala-D.-Aktivität.

Da die absoluten Ala-D.-Werte (große biologische Streuung) im Phosphat-Cystein- und auch Barbitalpuffer wesentlich breiter streuen als die prozentuale Aktivität im Barbitalpuffer gegenüber dem Phosphat-Cystein-Puffer (Tab.2), ist zur Erfassung der bleibedingten Ala-D.-Hemmung eine Doppelbestimmung im Phosphat-Cystein- und Barbital-Puffer sinnvoll. Damit sind nach Tab.2 Ala-D.-Werte im Barbital-Puffer von unter 60% der Aktivität am Phosphat-Cystein-Puffer als

möglicherweise pathologisch, als sicher pathologisch außerhalb der unteren 2-Sigma-Schranke Werte unter 28% anzusprechen (Abb.1). Tabl.2 läßt erkennen, daß eine geringe Restaktivität der Ala-D. unter 10^{-4} mol. Bleikonzentration erhalten bleibt. Abb.1 orientiert noch über die unter den angegebenen Bedingungen (Ala-D.-Doppelbestimmung) bei verschiedenen Graden von Bleibelastung ermittelten Ala-D.-Aktivitäten, die z.B. bei Bleiintoxikationen noch 6,8 % (bezogen auf Phosphat-Cystein-Puffer) bzw. 10,2% (eigentlicher, auf die reduzierte Normal-Aktivität im Barbitalpuffer abgestimmter Wert) beträgt. Für klinisch-diagnostische Zwecke ist die Lagerungsdauer von Erythrozyten bis zur Ala-D.-Bestimmung von Bedeutung. Die Ala-D.-Bestimmung nach 24- und 48-stündiger Lagerung der Erythrozyten bei Raumtemperatur ergab keinen signifikanten Unterschied im Phosphat-Cystein- und Barbitalsystem gegenüber Sofortbestimmung, die Mittelwerte zeigten jedoch eine leichte Tendenz zum Absinken, so daß eine 48-stündige Lagerung nicht überschritten werden sollte. Die Ala-D.-Bestimmung aus verschiedenen lang tiefgefroren aufbewahrten Erythrozyten ergab in mehreren Puffersystemen eine Aktivitätszunahme, was jedoch einer Überprüfung an einer größeren Fallzahl bedarf.

Da die Ala-D.-Untersuchungen in sehr verdünntem Hämolysat durchgeführt werden (siehe Methodik), wurde der Einfluß einer stärkeren Konzentrierung des Hämolysats auf die Ala-D.-Aktivität untersucht. Die Aktivität war im 2,44-fach konzentrierteren Inkubat (hinsichtlich des Hämolysatgehaltes) bei gleicher Bleikonzentration wesentlich höher (signifikant bei 10^{-6} und 10^{-7} mol., erhöhter Ala-D.-Gehalt berücksichtigt).

Im Rahmen anderer Thematik wurde auch ein Blei-Hemmversuch im menschlichen embryonalen Leberhomogenat durchgeführt. Dabei war bei normaler Ala-D.-Aktivität von 1,099 $\mu\text{Mol/g Leber/h}$ im Phosphat-Cystein-Puffer, im Barbitals- und Barbitals-Cystein-Puffer nur mehr eine Aktivität von

ca. 10% zu beobachten, die unter Bleikonzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-5} keine Tendenz zur Verminderung zeigte.

Die Untersuchungen im hochkonzentrierten Hämolystat unter Dauerinfusion kleiner Ala-Mengen kommen auf Grund der gewählten, weitgehend physiologischen Bedingungen (Methodik, Abschnitt 2) den tatsächlichen intraerythrozytären Verhältnissen sehr nahe und ermöglichen gleichzeitig die pauschale Erfassung des gesamten Ala-Metabolismus. In Abb. 2 sind die Enzym-Leistungen bezüglich der Ala-Utilisation für die Hämsynthese und des übrigen Ala-Abbaues bei Normalpersonen und serogenen hämolytischen Anämien ohne und mit Bleizusatz und Personen mit erhöhter Bleiaufnahme dargestellt. Es zeigt sich, daß bei gesunden Probanden bereits der Ala-Abbau gegenüber der Ala-Utilisation für die Hämsynthese deutlich überwiegt, noch wesentlich ausgeprägter ist dies infolge der Retikulozytose bei hämolytischen Anämien. Bemerkenswert ist, daß bereits bei Bleizusatz entsprechend einer Bleikonzentration von 10^{-7} Mol/l im Inkubat, somit bei Anhebung der Bleikonzentration um ca. 2 µg% bereits eine leichte signifikante Hemmung der Ala-D. eingetreten ist, während der Ala-Abbau noch weitgehend unbeeinträchtigt ist. Die Hemmung der Ala-D. eilt damit der des übrigen Ala-Abbaues etwas voraus, unter höheren Bleikonzentrationen, wie sie bei deutlich vermehrter Bleiaufnahme und Intoxikation vorliegen, sind die Ala-Utilisation und der Ala-Abbau etwa gleich intensiv gehemmt (Abb. 2) und entsprechend die Prozent-Relationen der beiden Stoffwechselwege bei 10^{-6} und 10^{-5} mol. Bleikonzentration und Bleikontamination gegenüber Normalpersonen nicht signifikant verschieden (Tab. 3). Serogene hämolytische Anämien verhalten sich hinsichtlich Ausmaß und Relation der Hemmung des Ala-D.-Metabolismus durch Blei etwa wie Normalpersonen.

Der deutlich reduzierte Ala-Metabolismus bei Personen mit erhöhter Bleiaufnahme (Abb. 2) wird bereits durch kleine Cysteinmengen $8,7 \times 10^{-3}$ mol durch partielle "Neutralisation" der Bleiwirkung um den Faktor 1,6 gesteigert,

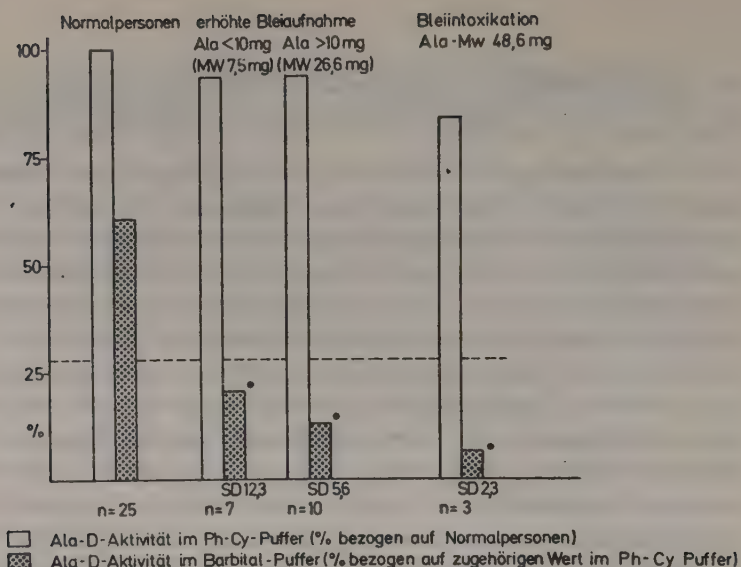


Abb.1: Ala-D.-Aktivität bei Bleiaufnahme und Bleiintoxikation (Normalpersonen im Phosphat-Cystein-Puffer =100 %); Mw= Mittelwert, SD=Standardabweichung; --- = untere 2-Sigma-Grenze für normale Barbitol-Puffer-Werte, Ph-Cy= Phosphat-Cystein-Puffer; * = signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) gegenüber Normalwerten.

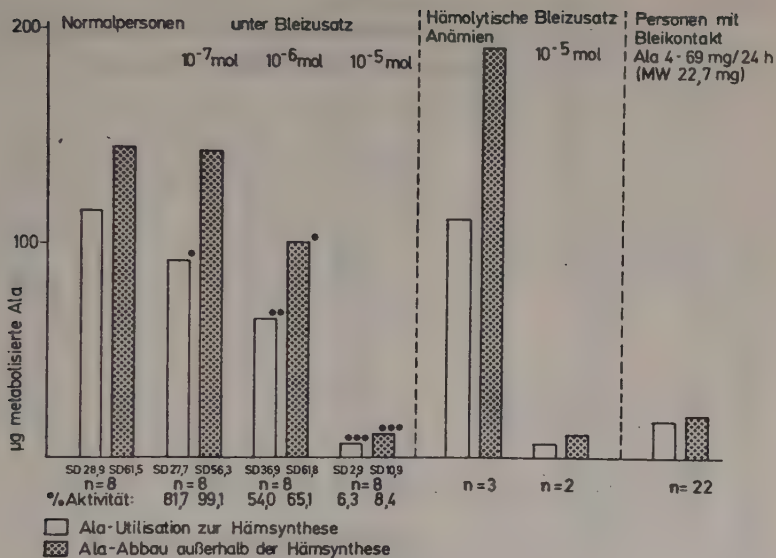


Abb.2: Erythrozytärer Ala-Metabolismus (Ala-D.-Aktivität und übriger Ala-Abbau) bei Normalpersonen, hämolytischen Anämien und Bleieinwirkung entsprechend Methodik, 2. Signifikanz gegenüber Normalkollektiv: $p < 0,1-0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$. Weitere Abkürzungen siehe Abb.1.

Tab. 1.: Verbleibende Restaktivität der Ala-D. bei Hämolysat-Inkubation im Phosphat-Cystein- und Phosphat-Puffer unter verschiedenen Bleikonzentrationen

	Bleikonzentration		
	10^{-7} mol.	10^{-6} mol.	10^{-5} mol.
Mittlere Restaktivität (%) im Phosphat-Cystein-Puffer n = 5	92,1 SD 6,7	75,1* SD 8,8	24,3*** SD 1,7
Mittlere Restaktivität (%) im Phosphat-Puffer n = 5	67,4** SD 9,8	24,7*** SD 3,8	29,7*** SD 2,9

n = Zahl der untersuchten Fälle

SD = Standardabweichung

Signifikante Unterschiede gegenüber entsprechenden Normalwerten (ohne Bleizusatz):

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

Tab. 2: Ala-D.-Aktivität in verschiedenen Puffern bei Sofortbestimmung, nach 24 h und 48 h, im 2,44-fach konzentrierten Hämolyt ohne und mit Bleizusatz (Pb)

	Ph-Cyst.	Ph	Ba-Cyst.	ohne Pb	Pb	Barbitalpuffer 10 ⁻⁶ mol. 10 ⁻⁷ %	10 ⁻⁶ %	10 ⁻⁵ %	10 ⁻⁴ mol 10 ⁻⁵ %
A. Normal konzentriertes Hämolyt Sofortbestimmung	1,271 mμM SD 0,41 n=25	48,7 SD 19,4 n=18	72,1 SD 17,6 n=18	60,7 SD 16,6 n=25	52,4 SD 13,5 n=15	33,9 SD 10,2 n=18	5,7 SD 3,4 n=19	2,2 SD 1,4 n=20	2,6 SD 1,3 n=6
B. Bestimmung nach 24 h, übrige Bedingungen wie A. Sofortbestimmung = 100 %	99,8 ⁺ SD 20,3 n=5	101,1 ⁺ SD 22,4 n=5	115,9 ⁺ SD 26,1 n=5	95,0 ⁺ SD 22,6 n=5	-	-	-	-	-
C. Bestimmung nach 48 h, übrige Bedingungen wie A. Sofortbestimmung = 100 %	94,9 ⁺ SD 19,4 n=5	88,0 ⁺ SD 28,1 n=5	99,8 ⁺ SD 33,2 n=5	81,8 ⁺ SD 13,7 n=5	-	-	-	-	-
D. 2,44-fach konzentriertes Hämolyt, Sofortbestimmung; höhere Ala-D.-Konzentration berücksichtigt	1,15 mμM = 100 % n=11	-	-	73,5 SD 15,8 n=11	69,8 SD 15,6 n=11	57,8 SD 16,3 n=11	14,9 SD 15,7 n=11	1,3 SD 1,6 n=11	1,3 SD 1,6 n=11

n = Zahl der untersuchten Fälle

SD = Standardabweichung

mμM = Aktivitätsangaben der Normalwerte im Phosphat-Cystein-Puffer in mμMol Porphobilinogen/h/ml Erythrozyten (=100 %); übrige Werte hierauf bezogen in % dieser Aktivität

[] = prozentuelle Aktivität gegenüber Barbitalpuffer ohne Bleizusatz

Ph = Phosphat-Puffer

Ph-Cyst = Phosphat-Cystein-Puffer

Ba-Cyst = Barbital-Cystein-Puffer

+ = kein signifikanter Unterschied gegenüber den Werten bei Sofortbestimmung (p < 0,2-0,5)

Signifikante Unterschiede gegenüber Barbitalpuffer ohne Bleizusatz:

* = p < 0,05- 0,1

*** = p < 0,01

**** = p < 0,001

Tab. 3: Relation (%) zwischen Ala-Utilisation für die Hämsynthese und Ala-Abbau

		Bleizusatz		
		ohne	10^{-7} mol	10^{-5} mol
A. Normalpersonen	Hämsynthese	45,9(SD 6,3)	$38,9^*(SD 6,3)$	$42,4^*(SD 14,7)$
	Ala-Abbau	54,1 n=12	61,1 n=8	57,6 n=8
B. Hämolytische Anämien; Reti- kulozyten 120-400 %	Hämsynthese	$37,1^*(SD 15,3)$	-	$44,0^+$
	Ala-Abbau	62,9 n=3	-	56,0 n=2
C. Bleiexponierte Personen, Kollektiv ent- sprechend Abb.2	Hämsynthese	$46,1^+(SD 13,8)$	-	-
	Ala-Abbau	53,9 n=22	-	-

* = $p < 0,1$ gegenüber Normalpersonen

+ = keine Signifikanz gegenüber Normalpersonen

Tab.4: Relation zwischen gebildeten Porphyrinen (POR) und Porphobilinogen (PBG)

	ohne Blei	Bleizusatz		
		10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵ mol
% PBG	35,8(SD 10,8)	41,9 [*] (SD 23,1)	39,3 [*] (SD 31,5)	33,8 [*] (SD 21,5)
% POR	64,2	58,1	60,7	66,2
% UP	16,3(SD 5,4)	20,8(SD 20,1)	23,5 [*] (SD 17,8)	29,2 ^{**} (SD 13,6)
% CP	78,2	74,7	75,2	70,8
% PP	5,5	4,1	1,3	-
POR=100%				

* = $p < 0,1$ gegenüber dem normalen Uroporphyrinanteil

** = $p < 0,01$ " " " "

+ = keine Signifikanz gegenüber dem normalen Porphyrinanteil

UP = Uroporphyrin

CP = Koproporphyrin

PP = Protoporphyrin

Tab.5: Erythrozytäre Ala-Permeabilität unter Bleieinwirkung; mittlere Erythrozyten-Ala bei Normalpersonen 27,6 µg%, bei Bleiexponierten 31,9 µg%.

	ohne Bleizusatz	Bleizusatz	
		2x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁴ mol
Normalpersonen; Diffusion in % der erythrozytären Ala/3h	18,0 SD 3,3	20,7 ⁺ SD 3,9	28,7 [*] SD 8,2
Bleiexponierte	17,0 SD 4,4	-	-

* = $p < 0,025$ gegenüber Proben von Normalpersonen ohne Bleizusatz

+ = keine Signifikanz gegenüber Proben von Normalpersonen ohne Bleizusatz

ohne daß eine signifikante Relationsverschiebung innerhalb der beiden Stoffwechselwege entsteht.

Tab. 4 enthält Angaben über die Relation der Hämpräkursoren innerhalb des Hämsynthese-Weges der Ala. Unter Bleieinwirkung bis zu einer Konzentration von 10^{-5} mol. tritt keine signifikante Verschiebung der Relation Porphobilinogen/Porphyrene ein, was den Schluß zuläßt, daß die Porphobilinogenase (Uroporphyrin synthetisierendes Enzymsystem) durch Blei nicht gehemmt wird. Innerhalb der Porphyrinfraction verschiebt sich bei 10^{-6} und 10^{-5} mol. Bleikonzentration signifikant der Uroporphyrin-Anteil, die Zunahme ist jedoch relativ gering. Die Synthese von Protoporphyrin ist, wie von reifen Erythrozyten zu erwarten, gering.

Die Daten zur erythrozytären Permeabilität für Ala zeigen erst bei einer 10-20-fach höheren Bleikonzentration (2×10^{-4} mol) als bei Intoxikationen eine signifikante Zunahme der Ala-Diffusion. Bei darunter liegenden Bleikonzentrationen und Personen mit erhöhter Bleiaufnahme unterhalb des Intoxikationsstadiums ergaben sich keine wertbaren Unterschiede gegenüber Normalpersonen.

V. Besprechung:

Die von zahlreichen Untersuchern angegebenen unverhältnismässig hohen Restaktivitäten der Ala-D. bei Bleivergiftung (1,3,7,16) sind aus methodischen Gründen (Bleiphosphat-Fällung) verständlich. Das den Erfordernissen der indirekten Blei-Diagnostik angepaßte Doppelbestimmungsverfahren in einem Puffersystem mit weitgehender Wiederherstellung der ursprünglichen Ala-D.-Aktivität und einem Puffersystem, das die tatsächliche Restaktivität der Ala-D. unter Bleieinwirkung zeigt, erbringt den Nachweis einer wesentlich ausgeprägteren Hemmung der Ala-D. durch Blei. Bei einer Bleikonzentration von 10^{-5} mol. (etwa der Intoxikation entsprechend) waren noch 3,6 %

(Tab.2), bei Bleivergiftungen selbst (Abb.1) noch 10,2% der ursprünglichen Ala-D.-Aktivität vorhanden. Verfolgt man die Ergebnisse der Ala-D.-Bestimmung im konzentrierten Hämolysat (Tab.2, D), so zeigt sich, daß jedenfalls unterhalb der maximalen Bleiwirkung - eine geringe Restaktivität der Ala-D. bleibt offen-
bar auch bei hohen Bleikonzentrationen erhalten - die Ala-D.-Aktivität signifikant gegenüber normal konzen-
triertem Hämolysat angestiegen ist. Aus diesen Befunden muß, wie in gewissem Umfang zu erwarten, auf die An-
wesenheit von reichlich bleiabfangenden intraerythro-
zytären "Protektoren" wie Bikarbonat-, Phosphat- u.a. Puffersysteme, Proteine u. Aminosäuren, insbesondere SH-Gruppen-haltige, geschlossen werden. Die regulären Inkubationen mit 10^{-5} mol. Bleizusatz zeigen daher in-
folge "Verdünnung" der Erythrozyten auf ca. 1:13 eine etwas zu starke, die Inkubation von Erythrozyten-Hämoly-
sat Bleivergifteter eine etwas zu schwache Hemmung der Ala-D., bezogen auf den interessierenden intraerythrozy-
tären Wert. Die wirkliche Ala-D.-Aktivität bei der Blei-
intoxikation ist daher als zwischen den beiden oben angegebenen Werten liegend zu erachten und beträgt etwa 6-10 %. Die mitgeteilte Ala-D.-Bestimmungsmethode kann
als Diagnostikum eingesetzt werden (12), der Zeitraum bis zur Analyse auf 24-48 Stunden ausgedehnt werden.
Die im Leberhomogenat erhobenen Befunde könnten für das Vorhandensein einer qualitativ vom roten Blutzellsystem
abweichenden, weniger bleisensiblen Ala-D. (Isoenzym?) sowie zahlreicher, die Bleiwirkung aufhebender Schutz-
stoffe (SH-Gruppen etc.) sprechen; in diesem Sinne könn-
ten auch die von GIBSON (3), allerdings im Phosphatpuf-
fer, erhobenen Befunde einer Ala-D.-Restaktivität im Rinderleberhomogenat von ca. 80 % bei einer extrem hohen
Bleikonzentration von 10^{-3} Mol/l gedeutet werden. Eine

klare Aussage ist bei den vorliegenden Befunden noch nicht möglich.

Die Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen (Methodik, 2) haben erkennen lassen, daß beim Ala-Metabolismus der Hauptstoffwechselweg der intraerythrozytär synthetisierten Ala nicht zur Hämsynthese, sondern zum Ala-Abbau außerhalb der Hämsynthese führt, besonders im retikulozytenreichen (120-400%) Blut (Abb.2), wo der Ala-Abbau ca. 2/3 des gesamten Ala-Metabolismus beträgt. Entsprechend dieser Tendenz kann man annehmen, daß die Ala in jungen roten Blutzellen (Knochenmark) zu über 80% abgebaut und nur zu weniger als 20% für die Hämsynthese verwertet wird. Auf Einzelheiten soll hier nicht eingegangen werden (13). Da sich diese Relationen, von einem geringen Vorseilen der Ala-D.-Hemmung bei minimalen Bleikonzentrationen abgesehen, bei Bleikonzentrationen bis zum Intoxikationsbereich im normalen wie retikulozytenreichen Blut (Abb.2, Tab.3) nicht signifikant ändern, ist zu folgern, daß entsprechend der gleichförmigen Hemmung des gesamten Ala-Metabolismus, über 80% der bei Bleibelastung ausgeschiedenen Ala nicht für die Hämsynthese, sondern zum Abbau bestimmt waren. Die relativ geringe Häm- bzw. Ala-Synthese nicht-erythropoetischer Organe (Leber, Niere, etc.) blieb unberücksichtigt. Die Hemmung des Ala-Abbaues ist somit die eigentliche Ursache der Ala-Ausscheidung bei der Bleiintoxikation. Würde dieser Stoffwechselblock unterbleiben, wäre bei Bleiintoxikation allenfalls mit einem kaum wahrnehmbaren Anstieg der Ala-Ausscheidung zu rechnen. Gleichzeitig wird verständlich, daß die Ausbildung einer Bleianämie auch bei beginnender Hämolyse (2) relativ spät erfolgt, da zumindest der sehr hoch erscheinende Ala-Verlust von oft über 50 mg täglich nur zum geringeren Teil die Hämsynthese betrifft. Hinsichtlich der Größenordnung der Ala-D.-Hemmung bei einer intoxicationsentsprechenden Bleikonzentration von 10^{-5} Mol./l ist festzustellen, daß die im Inkubat unter physiologischen,

den intraerythrozytären Verhältnissen nahestehenden Bedingungen ermittelte Ala-D.-Restaktivität mit 6,3% gut mit den vorher angegebenen intraerythrozytären Werten übereinstimmt.

Die Ergebnisse nach Tab.4 sprechen gegen eine Hemmung der Prophobilinogenase und für eine nur sehr schwache Hemmung des Uroporphyrin decarboxylierenden Enzymsystems, in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungsergebnissen (9).

Eine wesentliche Zunahme der erythrozytären Ala-Permeabilität war erst bei extrem hoher Bleikonzentration zu beobachten, was wohl auch für junge Zellen des erythrozytären Systems gelten dürfte, so daß diesem Faktor zumindest quantitativ keine entscheidende Bedeutung zukommt.

VI. Zusammenfassung:

Mittels vergleichender Aktivitätsuntersuchungen in geeignetem Puffersystem zwischen Phosphat-Cystein-Puffer und Barbitalpuffer konnte eine, die bisherige Mitteilungen weit übertreffende Hemmung der Ala-Dehydrase durch Blei nachgewiesen werden. Bei Bleiintoxikationen betrug die Restaktivität dieses Enzyms ca. 10%.

Untersuchungen zum Ala-Metabolismus im hochkonzentrierten nativen Hämolytat unter weitgehend physiologischen Bedingungen (Ala-Spiegel 230 µg%) zeigen, daß bereits im normalen Blut der Ala-Abbau die Ala-Utilisation für die Hämsynthese übertrifft (ca. 54 : 46%) und im retikulozytenreichen Blut noch zunimmt (ca. 63 : 37 %). In jungen, zur Hämsynthese befähigten Blutzellen wird somit weniger als 1/5 des Ala-Angebots zur Hämsynthese verwendet. Blei hemmt, von einem Vorseilen der Ala-Dehydrase-Hemmung bei niedrigen Konzentrationen abgesehen, in etwa gleicher Weise beide Stoffwechselwege der Ala. Dies bedeutet, daß über 4/5 der bei Bleivergiftungen auftretenden

den D-Alaacidurie dem Ala-Abbauweg entstammen und nur ein relativ kleiner Anteil der Hämsynthese entzogen wird. Dies erklärt u.a. auch die späte Manifestation einer Bleianämie trotz hochgradiger Ala-Ausscheidung von oft über 50 mg/die.

Eine wesentliche, erythrozytäre Permeabilitätssteigerung war erst bei extremen Bleikonzentrationen (2×10^{-4} mol) festzustellen, so daß diesem Faktor keine entscheidende Bedeutung zukommen dürfte.

Literatur

1. Battistini, J.J.,
Morrow D.,
Ginsburg G.,
Thompson M.R.,
Moore R.,
Goldberg A. Erythrocyte Delta-Aminolaevulic Acid De-
hydrase Activity in Anaemia
Brit. J. Haemat. 20 (1971) 177
2. Berk P.D.,
Tschudy D.P.,
Shepley L.A.,
Berlin N.I. Hematologic and Biochemical Studies in a
Case of Lead Poisoning
Amer.J.Med. 48 (1970) 137
3. Gibson K.D.,
Neuberger A.,
Scott J.J. The Purification and Properties of Delta-
Aminolaevulic Acid Dehydrase
Biochem.J. 61 (1955) 618
4. Gibson S.L.M.,
Goldberg A. Defects in Haem Synthesis in Mammalian Tissues
in Experimental Lead Poisoning and Experi-
mental Porphyria
Clin. Science 38 (1970) 63
5. Goldberg A. Lead Poisoning As a Disorder of Heme Synthesis
Seminars Hemat. 5 (1968) 424
6. Haeger-Aronsen B. Studies on urinary excretion of delta-amino-
levulic acid and other heme precursors in
lead workers and lead intoxicated rabbits
Scand.J.clin.Lab.Invest. 12 (1960) 47
7. Iwanow E.D. Die Rolle der Delta-Aminolävulinsäure-Dehy-
drase (ALA-D) in den Erythrozyten bei der
Erforschung der Biosynthese der Porphyrine
Fol.Haemat. 89 (1965) 233
8. Mauzerall D.,
Granick S. The occurrence and determination of delta-
aminolevulinic acid and porphobilinogen in ur-
in
J.biol.Chem. 219 (1961) 338
9. Schmidt, D.,
Stich W. Das Urin-Porphyrinogramm bei der Bleiintoxi-
kation
Dtsch.Med. Wschr. 32 (1972) 1176
10. Schmidt D.,
Stich W. Zur Frühdiagnostik der Blei-Intoxikation:
Schnellnachweise der Delta-Aminolävulinsäure
Fortschr.Med. 8 (1971) 328
11. Schmidt D.,
Dech G.,
Fikentscher R.,
Stich W. Untersuchungen über die fetale Häm-synthese
in verschiedenen Blutbildungsphasen
Blut, 1. Druck
12. Schmidt D.,
Stich W. Diagnostische Kriterien erhöhter Bleiaufnahme
Publikation in Vorbereitung
13. Schmidt D.,
Pape
Stich W. Untersuchungen über den Ala-Metabolismus
Publikation in Vorbereitung
14. Schwartz S.,
Bergh M.H.,
Bossenmaier J.
Dinsmore. Determination of Porphyrins in biological
Materials
Meth.Biochem.Anal. 8 (1958) 253

15. Stich W. Delta-Aminolävulinacidurie. Ein
neuesbiochemisches und diagnostisches
Kriterium der Bleivergiftung
Klin. Wschr. 39 (1961) 338
16. Weissberg J.B., Delta-Aminolevulinic Acid Dehydrase
Activity
Lipschutz F., In Circulating Blood Cells
Oski F.A. New Engl.J.Med. 284 (1971) 565
17. Documenta Geigy, wissenschaftliche Tabellen,
Basel 1968

Herrn Professor Dr. W.Stich sei recht herzlich für
die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut gedankt.

Herrn Dr. D.Schmidt danke ich für die wertvollen
Anregungen und die wissenschaftliche Betreuung
während der Anfertigung dieser Arbeit.

L e b e n s l a u f :

Geboren am 4.8.1946 in München als Sohn des prakt. Arztes Dr.med.Reinhard SCHYMURA und seiner Ehefrau Gertrud SCHYMURA.

Besuch der Volksschule Leipziger Straße, München (1952 - 1956).

Übertritt in das neusprachliche Gymnasium.

Abitur Juli 1966 am Nymphenburger Gymnasium, München.

Beginn des Medizinstudiums im Wintersemester 1966/67 an der Universität München.

Naturwissenschaftliche Vorprüfung nach dem Wintersemester 1968.

Oktober 1968, Tod meines Vaters.

Ärztliche Vorprüfung nach dem Wintersemester 1969.

Ärztliche Prüfung von März 1972 bis Juni 1972 an der Universität München.

15.8.1972 bis 31.10.1972 Medizinalassistent an der Dermatologischen Universitätsklinik München.

24.10.1972, Tag meiner mündlichen Doktorprüfung.

Seit 1.11.1972 Medizinalassistent an der 1. Medizinischen Universitätsklinik München.

Verheiratet bin ich seit dem 29.9.1972 mit der Studentin der Mathematik und Physik, Johanna Schymura, geb. Kammermeier.

München, November 1972

